DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04245

甘蓝型油菜容重及其相关性状的全基因组关联分析

雷 维^{1,2} 王瑞莉¹ 王刘艳¹ 袁 芳^{1,2} 孟丽姣^{1,2} 邢明礼^{1,2}
徐 璐^{1,2} 唐章林^{1,2} 李加纳^{1,2} 崔 翠^{1,*} 周清元^{1,2,*}

¹ 西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400715; ² 重庆市油菜工程技术研究中心, 重庆 400715

摘 要: 种子容重大小反映了作物光合产物在籽粒中的积累特性, 是油菜千粒重重要的组成部分, 筛选高容重种质资源, 研究容重的遗传特性在油菜遗传育种中具有非常重要的作用。本文以不同遗传背景的 187 份甘蓝型油菜品种(系)构成的自然群体为研究对象, 进行 2 年种子的容重及其相关性状(千粒重、体积)测定和资源评价, 基于最优模型对各性状进行全基因组关联分析(genome-wide association analysis, GWAS)和候选基因预测。结果显示, 187 份材料在 2 年中容重及其关联性状在品种(系)间差异均达到显著水平($P < 0.05$), 筛选出 3 个种子千粒重较大的高容重种质资源。全基因组关联分析共检测到 24 个与种子容重及其相关性状显著关联的 SNP 位点, 可解释表型变异的 8.21%~10.40%。通过单倍型分析确定关联 SNP 位点的 Block 区间, 其所在的 Block 覆盖了 12 个与容重、粒重和体积有关的候选基因, 主要编码转录因子(如 WOX8、HAIKU1、AP2/ERF 转录因子、Dof 家族-Zinc finger 超家族和 BZR1 转录因子)、酶类(如 BKI1、KAT2、CEL1 和 UBP15)、DNA 结合蛋白和激素响应蛋白(如 ARF2 和 J3)。本研究结果将为进一步解析油菜千粒重的遗传机制、培育高容重油菜品种及后续基因的功能研究提供理论依据。

关键词: 甘蓝型油菜; 容重; 千粒重; 体积; 全基因组关联分析

Genome-wide association study of seed density and its related traits in *Brassica napus* L.

LEI Wei^{1,2}, WANG Rui-Li¹, WANG Liu-Yan¹, YUAN Fang^{1,2}, MENG Li-Jiao^{1,2}, XING Ming-Li^{1,2}, XU Lu^{1,2}, TANG Zhang-Lin^{1,2}, LI Jia-Na^{1,2}, CUI Cui^{1,*}, and ZHOU Qing-Yuan^{1,2,*}

¹ College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China; ² Chongqing rape Engineering Technology Research Center, Chongqing 400715, China

Abstract: Seed density reflects the accumulation characteristics of crop photosynthetic products in the grains, which plays an important role in the thousand-seed weight of rape. Selecting high seed density germplasm resources and studying the genetic characteristics of seed density are very important in the breeding of rapeseed. A natural population containing 187 *Brassica napus* L. varieties (lines) with different genetic backgrounds was used as plant materials to determine the seed density and its related traits (thousand-seed weight and seed volume) in the two environments. Genome-wide association study was carried out based on the optimal model and the candidate genes associated with seed density, thousand-seed weight, and seed volume was predicted. In the two years, there were significant differences in the seed density and its related traits among 187 materials at $P < 0.05$, and three materials with high seed density or thousand-seed weight were selected. A total of 24 SNP loci, that were significantly associated with seed density, seed weight, and seed volume, were identified by GWAS, which explained the phenotypic variation of 8.21%–10.40%. Haplotype analysis was used to determine the block interval of the SNP sites. The blocks containing 11 SNPs covered 12 candidate genes, which mainly encoded transcription factors such as WOX8, HAIKU1, AP2/ERF transcription factors, Dof family-zinc finger superfamily, BZR1

本研究由国家重点研发计划项目(2018YFD0100500), 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-12)和重庆市技术创新与应用发展项目(cstc2019jscx-msxmX0383)资助。

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0100500), the China Agriculture Research System (CARS-12), and the Chongqing Technology Innovation and Application Development Project (cstc2019jscx-msxmX0383).

* 通信作者(Corresponding authors): 崔翠, E-mail: cuicui@swu.edu.cn; 周清元, E-mail: qingyuan@swu.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: 1305600171@qq.com

Received (收稿日期): 2020-10-17; Accepted (接受日期): 2021-03-19; Published online (网络出版日期): 2021-04-01.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20210401.1050.006.html>

transcription factors, enzymes such as BK11, KAT2, CEL1, UBP15, DNA binding proteins, and hormone response proteins such as ARF2 and J3. These results provide the theoretical basis for the development of high seed density rape varieties and the functional research of subsequent genes.

Keywords: *Brassica napus* L.; seed density; thousand-seed weight; seed volume; genome-wide association study (GWAS)

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)是世界四大油料作物之一,也是食用植物油与动物饲料的重要来源^[1-2],提高油菜籽粒产量是油菜遗传育种研究最重要的方向之一。千粒重是油菜籽粒产量构成的重要组成部分,与单株产量有显著正相关关系^[3-6]。而千粒重(thousand-seed weight, TSW)主要由油菜种子体积(seed volume, SV)和容重(seed density, SD)来决定。油菜籽粒体积越大,库容量也越大,能贮藏更多的灌浆物质,这就为粒重的形成创造了条件^[7]。而油菜籽粒容重大小体现了籽粒内容物的充实程度,与光合产物的形成、运输、转化和储存有关,对千粒重大小和油菜产量具有非常重要的影响。因此,定位油菜籽粒容重关联的 QTL (数量性状基因座)并找到相关候选基因,对筛选高容重油菜种质、培育油菜高产品种具有非常重要的作用。

近年来,数量遗传学和现代生物技术的发展为作物育种带来新的活力,借助 DNA 分子标记和 QTL 作图,复杂的数量性状可被剖分为若干离散的孟德尔因子所决定的组分,进而确定其在染色体上的位置及其与其他基因的关系。千粒重是油菜产量构成的主要要素(每公顷单株数、单株角果数、每果粒数和千粒重)之一,是油菜高产育种的关键因子,被大家广泛重视,很多学者利用不同的分子标记和不同的研究群体,对不同环境条件下油菜千粒重进行 QTL 定位,获得了不同的研究结果^[8-16],为油菜分子育种奠定了一定基础。虽然容重在小麦^[17-19]、玉米^[20-23]、大豆^[24]等多种农作物中都被作为重要的品质性状,与千粒重(百粒重)具有非常重要的相关性,但是在油菜中研究极少。随着一些植物全基因组测序的完成,分子标记和生物信息学的迅速发展,全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)已经成为植物数量性状研究的热点之一。同时甘蓝型油菜全基因组序列的公布和芸薹属 SNP 芯片的开发,很多学者已经通过全基因组关联分析鉴定出与油菜重要农艺、品质和抗性等相关性状的 QTL 位点,解析其遗传结构并预测其候选基因^[25-29]。迄今,利用 GWAS 筛选甘蓝型油菜容重关联 SNP 位点,并充分利用已知物理位置 SNP 位点筛选候选基因未见报道。

本文以 187 份遗传来源不同的油菜品种(品系)构建的自然群体为研究对象,对该群体内各品种(系)容重、千粒重和体积进行比较和评价,筛选容重、千粒重都较大的种质资源;利用 60K SNP 芯片对该群体材料进行基因型分析,并对千粒重、体积、容重进行 GWAS,挖掘显著的 SNP 位点,预测其候选基因,以期控制容重性状的遗传解析奠定基础以及高产优质甘蓝型油菜新品种的选育提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

用于全基因组关联分析的自然群体为 187 份具有不同遗传背景和广泛地理来源的常规品种、品系(附表 1),均由重庆市油菜工程技术研究中心收集并提供。

1.2 田间试验

试验材料于 2018—2019、2019—2020 年度连续 2 年种植于重庆市北碚区歇马镇油菜基地。采用随机区组试验设计,3 次重复,每个材料重复种 3 行,每行 10 株。田间管理遵循常规生产方式,在油菜初花期套袋自交,种子完全成熟后每家系收取 3 株正常植株的种子,自然风干后保存。

1.3 性状测定

将每个品种的种子充分混匀,随机选取 1000 粒大小相似、饱满的油菜籽粒(随机取到的杂质或干瘪籽粒均去除),并用万分之一电子天平称其质量,重复 3 次,取其平均值。将挑选出来的油菜种子,平铺于扫描仪的底片支架上(种子之间相隔一定距离,不能重叠)。再利用爱普生扫描仪 V850 对油菜种子进行扫描拍照,保存图片文件。参考韩光明等^[30]的方法,得到油菜种子的数量以及油菜种子所占面积的百分比,计算出每一颗油菜种子所占的面积、半径以及体积。在 Excel 表中按照公式(容重=质量/体积)对每个材料的容重、粒重、体积进行计算。采用 Microsoft Excel 2016 软件对 187 份种质资源进行初步筛选排序,并计算其平均数、标准差和变异系数。

1.4 基因型分析

利用油菜基因组 60K Illumina Infinium SNP 芯

片, 参照 Chen 等^[26]和 Qu 等^[31]方法, 对 187 份材料进行基因型分析, 排除掉最小基因型频率(minor allele frequency, MAF)低于 5%和 SNP 得率(call frequency)小于 80%的 SNP 标记, 最终获得 15,436 个 SNP 标记用于关联分析。

1.5 群体结构分析与亲缘关系

利用 Structure 2.3.4 软件进行群体结构分析, 参照 Wan 等^[32]确定最终亚群数目。利用 Tassel 5.1.0 软件对自然群体进行亲缘关系评估, 计算亲缘关系 K 矩阵^[33]。利用 Tassel 5.1.0 软件分析连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)在甘蓝型油菜 A、C 染色体组上的分布, 绘制各染色体的 LD 衰减图^[28]。

1.6 全基因组关联分析

采用基于一般线性模型和混合线性模型共 6 种模型进行关联分析。利用 SAS 软件检验这 6 种模型的运算结果, 对 $-\log_{10}(P)$ 的观测值和 $-\log_{10}(P)$ 期望值绘制 Quantile-Quantile 散点图。在此基础上确定 3 个性状的最佳模型, 利用 haploview 软件绘制 Manhattan 图^[34]。本试验使用的 SNP 数据为 26,673 个, P 值大于阈值($-\log_{10}(1/26,673) = 4.4$)的位点为显著关联位点。

1.7 单倍型分析及候选基因筛选

利用 haploview 软件对显著性标记所在 LD 区间的 SNP 进行单倍型分析^[34], 参照 Qu 等^[31]方法设定参数。根据法国公布的甘蓝型油菜“Darmor-Bzh”基因组注释信息获取显著性标记所在的 Block 区间的基因及序列, 通过 BLAST 与拟南芥基因进行同源性比对, 将 E -value 阈值设定为 10^{-10} , 以相似度最高的拟南芥基因信息来注释油菜基因。

2 结果与分析

2.1 187 份甘蓝型油菜的表型特征及其容重评价

统计 187 份甘蓝型油菜容重、体积及千粒重 3 个性状的最大值、最小值、均值和变异系数, 并对每年品种(系)间进行方程分析(表 1)。3 个性状在 2 年各品种(系)间差异达到极显著水平($P < 0.01$), 变异系数介于 7.11%~35.93%之间, 其中籽粒大小(体积)变异系数最高、容重变异系数最低。差异显著性检验和变异系数结果都表明 187 份材料具有广泛的遗传变异范围。通过频次分布(图 1)可以看到, 3 个性状均呈现出连续性分布, 符合数量性状的遗传特点, 适合进行 GWAS 分析。

图 1 群体容重、千粒重和体积在 2 种环境下的频率分布

Fig. 1 Frequency distribution of seed density, 1000-seed weight, and seed volume in two environments

表 1 187 份甘蓝型油菜品种(系)籽粒容重、千粒重和体积的表型统计

Table 1 Phenotypic statistics of seed density, thousand-seed weight, and seed volume in 187 *Brassica napus* L.

性状 Trait	年份 Year	最大值 Max.	最小值 Min.	均值 Average	标准差 SD	变异系数 CV (%)
籽粒容重 Seed density (kg m ⁻³)	2018–2019	969.05	527.31	859.96**	61.16	7.11
	2019–2020	946.00	433.93	804.35**	99.47	12.37
体积 Seed volume (×10 ⁻⁹ m ³)	2018–2019	7.30	2.58	4.60**	0.89	19.38
	2019–2020	11.97	1.28	3.52**	1.27	35.93
千粒重 Thousand-seed weight (×10 ⁻³ kg)	2018–2019	5.75	1.73	3.95**	0.76	19.24
	2019–2020	7.39	0.70	2.80**	0.89	31.79

**代表在 0.01 水平显著相关。 ** indicates significant correlation at $P < 0.01$.

分别对 187 份材料的 2 年容重进行排序(附表 1), 容重较均值 859.96 kg m⁻³ 和 804.35 kg m⁻³ 的品种(系) 分别有 112 份和 115 份, 2 年均高于均值的有 81 份, 均低于均值的有 41 份。2 年容重均高于均值的 81 份甘蓝型油菜品种(系) 2018—2019 年度千粒重变化幅度为 $2.36 \times 10^{-3} \sim 5.75 \times 10^{-3}$ kg, 体积介于 $2.69 \times 10^{-9} \sim 6.36 \times 10^{-9}$ m³; 2019—2020 年度千粒重变化幅度为 $1.16 \times 10^{-3} \sim 5.01 \times 10^{-3}$ kg, 体积介于 $1.28 \times 10^{-9} \sim 6.01 \times 10^{-9}$ m³; 从 81 份变异范围和变异系数分析, 虽然较原始群体(187 份种质)相比, 变异范围变窄, 变异系数变小, 但是容重大的油菜品种(系)籽粒千粒重不一定大。对两年度的 81 份种质资源结果进行统

计(表 2)发现, 2018—2019 年度千粒重从大到小依次为 2012-9542 (5.75×10^{-3} kg)、中双 11 号(5.30×10^{-3} kg)、秦油 5 号(5.55×10^{-3} kg)、红油 3 号(5.29×10^{-3} kg)、青 662A (5.15×10^{-3} kg)、2012-5086 (5.12×10^{-3} kg)、SWU75 (4.99×10^{-3} kg)、浙油 18 (4.99×10^{-3} kg)、盐 6055 (4.97×10^{-3} kg)和沪油 17 号(4.93×10^{-3} kg); 2019—2020 年度平均千粒重仅 2.78×10^{-3} kg, 较 2018—2019 年度下降 1.28×10^{-3} kg, 千粒重 5.0×10^{-3} kg 以上的品种为黔油 331 (5.01×10^{-3} kg), 大于 4.0×10^{-3} kg 的有秦油 5 号(4.78×10^{-3} kg)、红油 3 号(4.43×10^{-3} kg); 综合两年度结果来看, 秦油 5 号、红油 3 号和黔油 331 为容重高和籽粒大(千粒重)的 3 个品种。

表 2 81 份高容重甘蓝型油菜品种(系)体积和千粒重的表型统计

Table 2 Phenotypic statistics of the thousand-seed weight and seed volume of 81 high test density in *Brassica napus* L.

性状 Trait	年度 Year	最大值 Max.	最小值 Min.	均值 Average	标准差 SD	变异系数 CV (%)
籽粒容重 Seed density (kg m ⁻³)	2018–2019	969.05	860.09	901.76**	26.41	2.93
	2019–2020	946.00	806.90	875.16**	31.35	3.58
体积 Seed volume (×10 ⁻⁹ m ³)	2018–2019	6.36	2.69	4.51**	0.78	17.30
	2019–2020	6.01	1.28	3.19**	0.87	27.26
千粒重 Thousand-seed weight (×10 ⁻³ kg)	2018–2019	5.75	2.36	4.06**	0.69	16.87
	2019–2020	5.01	1.16	2.78**	0.74	26.54

*和**分别代表在 0.05 和 0.01 水平上显著相关。

*, ** indicate significant correlation at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

在 2018—2019 年度, 千粒重与容重及体积存在着统计学意义上的极显著正相关($P < 0.01$) (表 3), 相关系数分别为 0.31 和 0.93, 体积与容重的相关性不显著; 在 2019—2020 年度, 体积与容重及千粒重均表现为极显著相关($P < 0.01$), 其中体积与容重两性状之间表现为极显著负相关, 相关系数为-0.29, 体积与千粒重表现为极显著正相关, 相关系数分别为 0.90。两年度中, 种子体积和千粒重均存在着显著正

相关, 说明油菜种子光合产物积累的“库”(体积)越大, 越有利于获得更大的千粒重; 容重与体积存在着负相关, 与千粒重存在着正相关, 说明在育种中筛选油菜籽粒容重更高的品种, 对油菜高产育种具有重要的意义。

2.2 容重及其相关性状的 6 种模型比较

利用 SAS 软件对容重、千粒重和体积关联分析 6 种模型下的运算结果绘制 Quantile-Quantile (Q-Q)

散点图。通过比较 6 种模型下 Q-Q 图的分布可以看出(图 2), 容重(SD)及体积(SV)的最佳模型都为 K+PCA 模型, 千粒重的最佳模型均为 K 模型。在最

优模型基础上绘制 Manhattan 图(图 3)。以 P 值小于阈值($1/26673 = 3.74911\text{E-}05$)确定显著关联 SNP 位点(表 4)。

表 3 油菜 3 种种子各性状间的相关性分析
Table 3 Correlation analysis of three traits of rape seeds

性状 Trait	容重 Seed density	体积 Seed volume	千粒重 Thousand-seed weight
容重 Seed density	1	-0.29**	0.1
体积 Seed volume	-0.03	1	0.90**
千粒重 Thousand-seed weight	0.31**	0.93**	1

*和**分别代表在 0.05 和 0.01 水平显著相关。上三角为 2019–2020 年度相关系数, 下三角为 2018–2019 年度相关系数。
* and ** indicate significant correlation at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively. The upper triangle represents the correlation coefficient from 2019 to 2020, while the lower triangle is the correlation coefficient from 2018 to 2019.

图 2 两年度中容重、千粒重和体积在各模型下的 QQ 图
Fig. 2 Quantile-Quantile plot for six models of association analysis using the optimal model for seeds density and its component trait in two years
A: 2018–2019 年度容重; B: 2019–2020 年度容重; C: 2018–2019 年度千粒重; D: 2019–2020 年度千粒重; E: 2018–2019 年度体积; F: 2019–2020 年度体积。
A: seed density in 2018 and 2019; B: seed density in 2019 and 2020; C: thousand-seed weight in 2018 and 2019; D: thousand-seed weight in 2019 and 2020; E: seed volume in 2018 and 2019; F: seed volume in 2019 and 2020.

2.3 全基因组关联分析

通过分析两年度数据,共检测到 24 个与容重及其相关性状(千粒重和体积)关联的 SNP 位点(图 3 和表 4)。其中,与容重关联的 SNP 位点共有 7 个,分别位于 A01、C02、C03、C07 和 C08 染色体上,可解释 8.43%~10.36%的表型变异,其中 2019—2020 年度 C03 染色体上的 Bn-scaff_16394_2-p777469 位点贡献率最大。与体积关联的 SNP 位点共有 15 个,2018—2019 年度 C09 染色体上只检测到 1 个 SNP

位点,2019—2020 年度共检测到 14 个 SNP,分别位于 A07 (2 个)、A10 (2 个)、C01 (3 个)、C04 (2 个)、C05 (2 个)和 C06 (3 个)染色体,可解释 8.21%~9.88%的表型变异,其中 2019—2020 年度 A07 染色体上的 Bn-Scaffold000232-p58128 和 Bn-A07-p3618045 位点贡献率最大。与千粒重关联的 SNP 位点仅在 2019—2020 年度的 C04 染色体上检测到 2 个,分别解释 8.43%和 10.40%的表型变异,这 2 个位点也在体积中被检测到。

图 3 两年度中容重及其相关性状的 Manhattan 图

Fig. 3 Manhattan plot of seeds density and its component trait in two years

A: 2018—2019 年度容重; B: 2019—2020 年度容重; C: 2018—2019 年度千粒重; D: 2019—2020 年度千粒重; E: 2018—2019 年度体积; F: 2019—2020 年度体积。

A: seed density in 2018 and 2019; B: seed density in 2019 and 2020; C: thousand-seed weight in 2018 and 2019; D: thousand-seed weight in 2019 and 2020; E: seed volume in 2018 and 2019; F: seed volume in 2019 and 2020.

表 4 容重、千粒重、体积相关性状的显著关联标记

Table 4 Summary of significant SNPs for seed density, thousand-seed weight, and seed volume

性状 Trait	环境 Environment	模型 Model	位点 SNP	染色体 Chr.	位置 Position	阈值 $-\log_{10}(P)$	贡献率 R^2 (%)	基因型 Loci
容重 Seed density	2018—2019	K+PCA	Bn-A01-p6774837	A01	6194252	5.12	9.52	T/C
			Bn-scaff_17067_1-p175366	C02	27613356	5.06	8.64	T/C
			Bn-A03-p8112016	C03	9899295	4.64	8.43	A/G
			Bn-scaff_16069_1-p1916253	C07	38327703	4.59	9.39	A/G
			Bn-scaff_21269_1-p313587	C08	37159594	4.53	8.54	A/G
	2019—2020	K+PCA	Bn-scaff_16394_2-p777469	C03	50479817	5.58	10.36	T/C
			Bn-scaff_16394_2-p510062	C03	50830988	4.95	9.20	T/C
体积 Seed volume	2018—2019	K+PCA	Bn-A10-p9973634	C09	40023501	4.41	8.22	A/C
	2019—2020	K+PCA	Bn-Scaffold000232-p58128	A07	826353	5.32	9.88	A/G

(续表 4)

性状 Trait	环境 Environment	模型 Model	位点 SNP	染色体 Chr.	位置 Position	阈值 $-\log_{10}(P)$	贡献率 R^2 (%)	基因型 Loci
			Bn-A07-p3618045	A07	5593584	5.32	9.88	T/C
			Bn-A10-p5210204	A10	4798717	4.43	8.25	T/G
			Bn-A10-p12933288	A10	12981101	4.88	9.07	A/C
			Bn-scaff_15838_5-p603655	C01	3432942	5.03	9.34	T/C
			Bn-scaff_17731_1-p749457	C01	7033263	4.41	8.21	A/C
			Bn-scaff_17731_1-p979512	C01	7260158	4.76	8.84	A/G
			Bn-scaff_21186_1-p36313	C04	43747053	4.65	8.65	A/G
			Bn-scaff_21566_1-p5088	C04	43859433	4.60	8.56	A/C
			Bn-scaff_16770_1-p306276	C05	35633542	5.26	9.78	T/C
			Bn-scaff_20270_1-p1211632	C05	41648492	5.04	9.37	T/C
			Bn-scaff_18439_1-p633449	C06	12752920	5.22	9.70	T/C
			Bn-scaff_15763_1-p595094	C06	20165181	4.65	8.64	T/G
			Bn-A07-p16045526	C06	26606197	4.63	8.62	A/C
千粒重 Thousand-seed weight	2018–2019 2019–2020	K K	— Bn-scaff_21186_1-p36313 Bn-scaff_21566_1-p5088	C04 C04	43747053 43859433	4.55 5.62	8.43 10.40	A/G A/C

K: 基于亲缘关系的混合线性模型; K+PCA: 基于亲缘关系和主成分分析的混合线性模型。

K: mixed linear model based on kinship; K+PCA: mixed linear model based on principal component analysis and kinship.

2.4 单倍型分析

对 24 个显著性标记所在 LD 区间的 SNP 进行单倍型分析表明, 显著性标记 Bn-scaff_17067_1-p175366、Bn-scaff_17731_1-p749457、Bn-scaff_18439_1-p633449 与至少 1 个 SNP 标记位于同一 Block, 显著性标记 Bn-scaff_21186_1-p36313 和 Bn-scaff_21566_1-p5088 与其他 7 个 SNP 位于同一个 112 kb 跨度的 Block, Bn-A03-p8112016、Bn-scaff_16069_1-p1916253、Bn-scaff_15838_5-p603655 和 Bn-A10-p9973634 未与其他 SNP 形成 Block (图 4)。由于在后续分析中未筛选到候选基因, 因此 Bn-A01-p6774837、Bn-scaff_21269_1-p313587、Bn-scaff_16394_2-p777469、Bn-scaff_16394_2-p510062、Bn-Scaffold000232-p58128、Bn-A07-p3618045、Bn-A10-p5210204、Bn-A10-p12933288、Bn-scaff_17731_1-p979512、Bn-scaff_16770_1-p306276、Bn-scaff_20270_1-p1211632、Bn-scaff_15763_1-p595094 和 Bn-A07-p16045526 未在图 4 中列出。

2.5 容重及其相关性状的候选基因筛选

本研究对容重及其相关性状进行全基因组关联分析, 共检测到 24 个显著相关的 SNP 位点, 可解释 8.21%~10.40% 的表型变异。基于甘蓝型油菜参考基因组序列, 显著性标记所在 Block 区间共

筛选出 12 个候选基因(图 4 和表 5), 其中, 与容重显著关联 SNP 标记的 Block 区间找到了 6 个重要候选基因; 在与体积显著关联 SNP 标记的 Block 区间中筛选出 5 个候选基因; 在与千粒重显著关联 SNP 标记的 Block 区间筛选出 1 个候选基因, 它们均在种子体积显著关联 SNP 标记的 Block 区间中找到。以上候选基因主要编码转录因子(如 *BnaC03g18850D*、*BnaC03g19320D*、*BnaC03g19550D*、*BnaC07g36540D* 和 *BnaC01g11380D*)、酶类(如 *BnaC02g28720D*、*BnaC03g18470D*、*BnaC04g43460D* 和 *BnaC01g06800D*)、DNA 结合蛋白(如 *BnaC06g10480D*) 和激素响应蛋白(如 *BnaC09g35740D* 和 *BnaC09g36560D*)。其中, *BnaC02g28720D* 和 *BnaC01g11380D* 均是 BR 信号通路的调控因子, 前者是 BRI1 的负调控因子, 通过调控 BR 信号途径的来改变性状表型^[35]; 后者是 BR 的下游转录因子, 它直接结合到多个调控种子大小的基因启动子上, 促进种子发育^[35]。*BnaC03g18470D* (*KAT2*) 通过影响脂肪酸 β 氧化过程来影响用于生长与繁殖的营养物质之间的平衡导致种子数减少^[36]。*BnaC03g18850D* (*WOX8*) 已被证实通过监管早期胚的发育形成以及与 *CLE8* 共同促进细胞生长和大小^[37]。

表 5 甘蓝型油菜容重相关性状的候选基因

Table 5 Summary of candidate genes associated with seed density and related traits in *Brassica napus* L.

性状 Trait	物理区间 Physical interval	甘蓝型油菜基因编号 Gene ID in <i>B. napus</i>	拟南芥基因 <i>Arabidopsis</i> gene	基因 Gene	参考文献 Reference
SD	26393356–28833356	<i>BnaC02g28720D</i>	<i>AT5G42750</i>	<i>BKI1</i>	[35]
	9439295–10359295	<i>BnaC03g18470D</i>	<i>AT2G33150</i>	<i>KAT2</i>	[36]
		<i>BnaC03g18850D</i>	<i>AT5G45980</i>	<i>WOX8</i>	[37]
		<i>BnaC03g19320D</i>	<i>AT2G35230</i>	<i>IKU1</i>	[38]
		<i>BnaC03g19550D</i>	<i>AT2G35700</i>	<i>ERF38</i>	[39]
	37927703–38727703	<i>BnaC07g36540D</i>	<i>AT4G21030</i>	<i>ATDOF4.2</i>	[40–41]
TSW	43147053–44459433	<i>BnaC04g43460D</i>	<i>AT1G70710</i>	<i>CEL1</i>	[42]
SV	2632942–4232942	<i>BnaC01g06800D</i>	<i>AT1G17110</i>	<i>UBP15</i>	[43]
	6233263–7833263	<i>BnaC01g11380D</i>	<i>AT1G75080</i>	<i>BZR1</i>	[35]
	43147053–44459433	<i>BnaC04g43460D</i>	<i>AT1G70710</i>	<i>CEL1</i>	[42]
	12082920–13422920	<i>BnaC06g10480D</i>	<i>AT1G54060</i>	<i>ASIL1</i>	[44]
	39083501–40963501	<i>BnaC09g35740D</i>	<i>AT3G61830</i>	<i>ARF2</i>	[45]
		<i>BnaC09g36560D</i>	<i>AT3G44110</i>	<i>J3</i>	[46]

SD: 容重; TSW: 千粒重; SV: 体积。

SD: seed density; TSW: thousand-seed weight; SV: seed volume.

3 讨论

甘蓝型油菜单株种子产量取决于单株角果数、每果粒数和千粒重^[47]。在产量性状中, 千粒重有很高的遗传力, 千粒重位点更容易被稳定的选择, 从而达到增产的目的^[48]。容重虽然是影响千粒重大小的重要影响因素, 但由于其测定相对较难, 在油菜上对其关注度相对较低。相同体积下, 提高籽粒容重, 可以提高油菜千粒重, 而容重提高必然有利于提高单株产量, 从而提高群体产量。籽粒体积大小反应了油菜光合产物积累的“库”容量, 容重大小则可以认为其与光合产物积累的特性有关。因此, 在油菜高产和高光效育种过程中, 除关注千粒重外, 还应该关注容重大小和影响因素。本文对具有不同遗传背景和来源的 187 份油菜资源的容重、千粒重、体积进行 2 个年度研究, 最终筛选出 3 个容重高、籽粒大(千粒重)的甘蓝型油菜种质, 为下一步选育高产优质甘蓝型油菜新品种提供参考依据和理论支持, 具有非常重要的实践和理论意义。

全基因组关联分析可以快速鉴定与目标性状关联的分子标记和基因, 是非常有效的定位候选基因的方法。随着 SNP 芯片技术的出现, 利用 GWAS 定位甘蓝型油菜复杂的数量性状如千粒重^[49]、每角粒数^[50]、主花序角果密度^[51]、角果长度^[52]等方面已取得重要进展。Li 等^[15]利用 60K 油菜芯片进行关联分析, 分别在 A07 和 A09 上找到 2 个千粒重位点, 解

释了 4.9%和 11.4%的表型变异。荐红举等^[16]通过包含 2795 个 SNP 位点的 RILs 群体连锁图谱在 5 个环境中共检测到 14 个 QTL, 分布在 A03、A05、A06、A07、A08、A10、C01、C02 和 C03 共 9 条染色体上。本文通过对 187 份材料的千粒重进行全基因组关联分析, 仅在 2019—2020 年度中检测到位于 C04 染色体上 2 个关联位点, 与 Shi 等^[6]检测到的千粒重 QTL $q0913$ 和 $q0914$ 位于同一染色体, 两者相距较近。本文检测到的油菜千粒重位点较少, 可能和群体遗传组成、环境因素有关。油菜种子千粒重可进一步分解为种子体积大小和种子内容物充实程度(种子容重), 解析千粒重形成的遗传机制将为选育大粒油菜新品种奠定分子基础。本文中检测到的与容重关联的 7 个 SNP 位点和与体积关联的 15 个 SNP 位点为进一步研究油菜籽粒这 2 个性状的 QTL 奠定基础, 为挖掘与油菜容重和大小有关的基因提供重要参考。另外, 在 2019—2020 年度, 本研究在 C04 染色体 43.75 Mb 和 43.86 Mb 区间连续检测到千粒重位点 Bn-scaff_21186_1-p36313、Bn-scaff_21566_1-p5088, 也同时检测到种子体积大小位点, 表明这些位点具有“一因多效”作用。

本研究通过关联分析, 扫描与性状关联的 SNP 位点的 LD 区间并进行单倍型分析, 借助甘蓝型油菜“Darmor-Bzh”基因组注释信息和拟南芥基因组数据库, 结果共筛选出 12 个与种子发育相关的候选基因。这些基因可能通过转录因子途径、泛素途径、

IKU 途径和激素等通路来调控种子发育^[53-54]。本研究检测到的 QTL 区域是依据每条染色体 LD 衰减距离及显著性峰值 SNP 位点确定的, 通过对显著性标记所在 LD 区间的 SNP 进行单倍型分析, 再利用基因注释筛选显著性标记所在的 Block 区间的基因, 这大大增加了候选基因筛选的效率及可靠性。本文筛选到的这些候选基因在油菜种子容重及其相关性状形成的具体作用还有待进一步研究验证。

4 结论

本文筛选出 3 个种子千粒重较大的高容重种质资源; 通过全基因组关联分析检测到与容重及其关联性状显著关联的 24 个 SNP 位点, 其所在的 Block 筛选到 12 个候选基因, 主要编码转录因子、酶类、DNA 结合蛋白和激素响应蛋白等, 均与种子大小与内容物充实有关。

附表 请见网络版: 1) 本刊网站 <http://zwxb.chinacrops.org/>; 2) 中国知网 <http://www.cnki.net/>; 3) 万方数据 <http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zuowxb.aspx>。

References

- [1] 刘后利. 实用油菜栽培学. 上海: 上海科学技术出版社, 1987. pp 316–320.
Liu H L. Practical Rape Cultivation. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1987. pp 316–320 (in Chinese).
- [2] 涂金星, 傅廷栋. 油菜品质育种现状及展望. 植物遗传资源学报, 2001, 2(4): 53–58.
Tu J X, Fu T D. The status and prospects of quality breeding of rape. *J Plant Genet Resour*, 2001, 2(4): 53–58 (in Chinese with English abstract).
- [3] Clarke J M, Simpson G M. Influence of irrigation and seeding rates on yield and yield components of *Brassica napus* L. cv. tower. *Can J Plant Sci*, 1978, 58: 731–737.
- [4] Butruille D V, Guries R P, Osborn T C. Linkage analysis of molecular markers and quantitative trait loci in populations of inbred backcross lines of *Brassica napus* L. *Genetics*, 1999, 153: 949–964.
- [5] Lionneton E, Aubert G, Ochatt S, Merah O. Genetic analysis of agronomic and quality traits in mustard (*Brassica juncea*). *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 792–799.
- [6] Shi J, Li R, Qiu D, Jiang C, Long Y, Morgan C, Bancroft L, Zhao J Y, Meng J L. Unraveling the complex trait of crop yield with quantitative trait loci mapping in *Brassica napus* L. *Genetics*, 2009, 182: 851–861.
- [7] 惠飞虎, 石剑飞, 孙家刚, 冷锁虎, 唐瑶, 左青松. 油菜的源库关系研究: III. 油菜库容变化对粒重的影响. 江苏农业学报, 2006, 22: 109–112.
Hui F H, Shi J F, Sun J G, Leng S H, Tang Y, Zuo Q S. Studies on source and sink of rapeseed: III. Effect of sink change on seed weight in rapeseed. *J Jiangsu Agric Sci*, 2006, 22: 109–112 (in Chinese with English abstract).
- [8] 易斌, 陈伟, 马朝芝, 傅廷栋, 涂金星. 甘蓝型油菜产量及相关性状的 QTL 分析. 作物学报, 2006, 32: 676–682.
Yi B, Chen W, Ma C Z, Fu T D, Tu J X. Mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in *Brassica napus* L. *Acta Agron Sin*, 2006, 32: 676–682 (in Chinese with English abstract).
- [9] Quijada P A, Udall J A, Lambert B, Osborn T C. Quantitative trait analysis of seed yield and other complex traits in hybrid spring rapeseed (*Brassica napus* L.): 1. Identification of genomic regions from winter germplasm. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 549–561.
- [10] Udall J A, Quijada P A, Lambert B, Osborn T C. Quantitative trait analysis of seed yield and other complex traits in hybrid spring rapeseed (*Brassica napus* L.): 2. Identification of alleles from unadapted germplasm. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 597–609.
- [11] Radoev M, Becker H C, Ecke W. Genetic analysis of heterosis for yield and yield components in rapeseed (*Brassica napus* L.) by quantitative trait locus mapping. *Genetics*, 2008, 179: 1547–1558.
- [12] Fan C C, Cai G Q, Qin J, Li Q Y, Yang M G, Wu J Z, Fu T D, Liu K D, Zhou Y M. Mapping of quantitative trait loci and development of allele-specific markers for seed weight in *Brassica napus* L. *Theor Appl Genet*, 2010, 121: 1289–1301.
- [13] Yang P, Shu C, Chen L, Xu J, Wu J, Liu K. Identification of a major QTL for silique length and seed weight in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet*, 2012, 125: 285–296.
- [14] Qin L P, Mao L, Sun C M, Pu Y Y, Fu T D, Ma C Z, Shen J X, Tu J X, Yi B, Wu J. Interpreting the genetic basis of silique traits in *Brassica napus* L. using a joint QTL network. *Plant Breed*, 2014, 133: 52–60.
- [15] Li F, Chen B Y, Xu K, Wu J F, Song W L, Bancroft I, Harper A L, Trict M, Liu S Y, Gao G Z, Wang N A, Yan G X, Qiao J W, Li J, Li H, Xiao X, Zhang T Y, Wu X M. Genome-wide association study dissects the genetic architecture of seed weight and seed quality in rapeseed (*Brassica napus* L.). *DNA Res*, 2014, 21: 355–367.
- [16] 荐红举, 魏丽娟, 李超, 唐章林, 李加纳, 刘列钊. 基于 SNP 遗传图谱定位甘蓝型油菜千粒重 QTL 位点. 中国农业科学, 2014, 47: 3953–3961.
Jian H J, Wei L J, Li C, Tang Z L, Li J N, Liu L Z. QTL mapping of 1000-seed weight in *Brassica napus* L. by using the high density SNP genetic map. *Sci Agric Sin*, 2014, 47: 3953–3961 (in Chinese with English abstract).
- [17] 张晓芳, 张玉良. 我国小麦籽粒容重的研究. 作物品种资源, 1997, 12(2): 24–25.
Zhang X F, Zhang Y L. Studies on the seed density of wheat in our country. *Crop Var Res*, 1997, 12(2): 24–25 (in Chinese with English abstract).
- [18] 刘保华, 马永安, 赵勇, 田纪春, 海燕, 杨学举. 普通小麦籽粒比重的 QTL 分析. 河北农业大学学报, 2013, 36(5): 1–5.
Liu B H, Ma Y A, Zhao Y, Tian J C, Hai Y, Yang X J. QTLs mapping for grain specific gravity in common wheat. *J Agric Univ Hebei*, 2013, 36(5): 1–5 (in Chinese with English abstract).
- [19] 王霖, 冯维营, 黄玲, 邵敏敏, 孙雷明, 王洪刚. 小麦容重

- QTL 定位. 山东农业科学, 2014, 46(4): 24–27.
- Wang L, Feng W Y, Huang L, Shao M M, Sun L M, Wang H G. QTL mapping for wheat test weight. *Shandong Agric Sci*, 2014, 46(4): 24–27 (in Chinese with English abstract).
- [20] 车海先, 李海玉. 玉米容重影响因素浅析. 粮食与食品工业, 2011, 18(1): 56–58.
- Che H X, Li H Y. Analysis of influencing factors on maize test weight. *Cereal Food Ind*, 2011, 18(1): 56–58 (in Chinese with English abstract).
- [21] Ding J Q, Ma J L, Zhang C R, Dong H F, Xi Z Y, Xia Z L, Wu J Y. QTL mapping for test weight by using F_{2:3} population in maize. *J Genet*, 2011, 90: 75–80.
- [22] 许理文, 段民孝, 田红丽, 宋伟, 王凤格, 赵久然, 刘保林, 王守才. 基于 SNP 标记的玉米容重 QTL 分析. 玉米科学, 2015, 23(5): 21–25.
- Xu L W, Duan M X, Tian H L, Song W, Wang F G, Zhao J R, Liu B L, Wang S C. QTL Identification for test weight based on SNP mapping in maize. *J Maize Sci*, 2015, 23(5): 21–25 (in Chinese with English abstract).
- [23] 郭晋杰, 韩新桐, 张静, 陈景堂. 基于高密度遗传连锁图谱定位玉米子粒容重及相关性状 QTL. 玉米科学, 2018, 26(6): 27–32.
- Guo J J, Han X T, Zhang J, Chen J T. High-density genetic linkage map construction and QTL mapping for kernel test weight and related traits in maize. *J Maize Sci*, 2018, 26(6): 27–32 (in Chinese with English abstract).
- [24] 刘文博. 大豆籽粒容重与种子萌发的相关性研究. 沈阳农业大学硕士学位论文, 辽宁沈阳, 2018.
- Liu W B. Correlation between Bulk Density and Seed Germination. MS Thesis of Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning, China, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [25] Sun C M, Wang B Q, Yan L, Hu K N, Liu S, Zhou Y M, Guan C Y, Zhang Z Q, Li J N, Zhang J F, Chen S, Wen J, Ma C Z, Tu J X, Shen J X, Fu T D, Yi B. Genome-wide association study provides Insight into the genetic control of plant height in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1102–1114.
- [26] Chen L L, Wan H P, Qian J L, Guo J B, Sun C M, Wen J, Yi B, Ma C Z, Tu J X, Song L Q, Fu T D, Shen J X. Genome-wide association study of cadmium accumulation at the seedling stage in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Front Plant Sci*, 2018, 9: 375–389.
- [27] Xu L P, Hu K N, Zhang Z Q, Guan C Y, Chen S, Hua W, Li J N, Wen J, Yi B, Shen J X, Ma C Z, Tu J X, Fu T D. Genome-wide association study reveals the genetic architecture of flowering time in rapeseed (*Brassica napus* L.). *DNA Res*, 2016, 23: 43–52.
- [28] Liu S, Fan C C, Li J N, Cai G Q, Yang Q Y, Wu J, Yi X Q, Zhang C Y, Zhou Y M. A genome-wide association study reveals novel elite allelic variations in seed oil content of *Brassica napus* L. *Theor Appl Genet*, 2016, 129: 1203–1215.
- [29] Hatzig S V, Frisch M, Breuer F, Nesi N, Ducourmau S, Wagner M H, Leckband G, Abbdadi A, Snowdon R J. Genome-wide association mapping unravels the genetic control of seed germination and vigor in *Brassica napus* L. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 221–233.
- [30] 韩光明, 蓝家样, 陈全求, 张胜昔, 李国荣. 一种利用 ImageJ 软件对棉花种子的计数方法. 棉花科学, 2019, 41(2): 2–5.
- Han G M, Lan J Y, Chen Q Q, Zhang S X, Li G R. A method for counting cotton seeds using ImageJ software. *Cotton Sci*, 2019, 41(2): 2–5 (in Chinese with English abstract).
- [31] Qu C M, Li J N, Fu F Y, Zhao H Y, Lu K, Wei L J, Xu X F, Liang Y, Li S M, Wang R, Li J N. Genome-wide association mapping and Identification of candidate genes for fatty acid composition in *Brassica napus* L. using SNP markers. *BMC Genomics*, 2017, 18: 232–248.
- [32] Wan H P, Chen L L, Guo J B, Li Q, Wen J, Yi B, Ma C Z, Tu J X, Fu T D, Shen J X. Genome-wide association study reveals the genetic architecture underlying salt tolerance-related traits in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Front Plant Sci*, 2017, 8: 593–607.
- [33] Bradbury P J, Zhang Z W, Kroon D E, Casstevens T M, Ramdoss Y, Buckler E S. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 2007, 23: 2633–2635.
- [34] Barrett J, Fry B, Maller J, Daly M. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 2005, 21: 263–265.
- [35] Jiang W, Huang H, Hu Y, Zhu S, Wang Z, Lin W. Brassinosteroid regulates seed size and shape in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2013, 162: 1965–1977.
- [36] Footitt S, Cornah J E, Pracharoenwattan A I, Bryce J H, Smith S M. The *Arabidopsis* 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 (kat2-1) mutant exhibits increased flowering but reduced reproductive success. *J Exp Bot*, 2007, 58: 2959–2968.
- [37] Zhu T, Moschou P N, Alvarez J M, Sohlberg J J, Von A S. Wuschel-related homeobox 2 is important for protoderm and suspensor development in the gymnosperm norway spruce. *BMC Plant Biol*, 2016, 16: 19–33.
- [38] Garcia D, Fitz G J N, Berger F. Maternal control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to determine seed size in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005, 17: 52–60.
- [39] Lasserre E, Jobet E, Llauro C, Delseny M. *AtERF38* (*At2g35700*), an AP2/ERF family transcription factor gene from *Arabidopsis thaliana*, is expressed in specific cell types of roots, stems and seeds that undergo suberization. *Plant Physiol Biochem*, 2008, 46: 1051–1061.
- [40] Kushwaha H, Jillo K W, Singhl V K, Kumar A, Yadav D. Assessment of genetic diversity among cereals and millets based on PCR amplification using Dof (DNA binding with One Finger) transcription factor gene-specific primers. *Plant Syst Evol*, 2015, 301: 833–840.
- [41] Gupta S, Pathak R K, Gupta S M, Gaur V S, Singh N K, Kumar A. Identification and molecular characterization of transcription factor gene family preferentially expressed in developing spikes of *Eleusine coracana* L. *3 Biotech*, 2018, 8: 82.
- [42] Shani Z, Dekel M, Tsabary G, Shoseyov O. Cloning and characterization of elongation specific endo-1,4-[beta]-glucanase (cel1) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 1997, 34: 837–842.
- [43] Li N, Li Y. Ubiquitin-mediated control of seed size in plants. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 332–337.
- [44] Gao M J, Lydiate D J, Li X, Lui H, Gjetvaj B, Hegedus D D, Rozwadowski K. Repression of seed maturation genes by a trihelix transcriptional repressor in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell*, 2009, 21: 54–71.

- [45] Schruff M, Spielman M, Tiwari S, Adams S, Fenby N, Scott R. The auxin response factor 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development*, 2006, 133: 251–261.
- [46] Salas-Munoz S, Rodriguez-Hernandez A A, Ortega-Amaro M A, Salazar-Badillo F B, Jimenez-Bremont J F. *Arabidopsis AtDJA3* null mutant shows increased sensitivity to abscisic acid, salt, and osmotic stress in germination and post-germination stages. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 220–230.
- [47] Chen W, Zhang Y, Liu X P, Chen B Y, Tu J X, Fu T D. Detection of QTL for six yield-related traits in oilseed rape (*Brassica napus*) using DH and immortalized F₂ populations. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 849–858.
- [48] Brinton J, Simmonds J, Uauy C. Ubiquitin-related genes are differentially expressed in isogenic lines contrasting for pericarp cell size and grain weight in hexaploid wheat. *BMC Plant Biol*, 2018, 18: 22–28.
- [49] Khan S U, Yang M J, Liu S, Zhang K, Khan M H U, Zhai Y G, Olalekan A, Fan C C, Zhou Y M. Genome-wide association studies in the genetic dissection of ovule number, seed number, and seed weight in *Brassica napus* L. *Ind Crops Prod*, 2019, 142: 111877.
- [50] 孙程明, 陈锋, 陈松, 彭琦, 张维, 易斌, 张洁夫, 傅廷栋. 甘蓝型油菜每角粒数的全基因组关联分析. *作物学报*, 2020, 46: 147–153.
- Sun C M, Chen F, Chen S, Peng Q, Zhang W, Yi B, Zhang J F, Fu T D. Genome-wide association study of seed number per silique in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Acta Agron Sin*, 2020, 46: 147–153(in Chinese with English abstract).
- [51] 任义英, 崔翠, 王倩, 唐章林, 徐新福, 林呐, 殷家明, 李加纳, 周清元. 油菜主花序角果密度及其相关性状的全基因组关联分析. *中国农业科学*, 2018, 51: 1020–1033.
- Ren Y Y, Cui C, Wang Q, Tang Z L, Xu X F, Lin N, Yin J M, Li J N, Zhou Q Y. Genome-wide association analysis of silique density on racemes and its component traits in *Brassica napus* L. *Sci Agric Sin*, 2018, 51: 1020–1033 (in Chinese with English abstract).
- [52] 周庆红, 周灿, 郑伟, 付东辉. 甘蓝型油菜角果长度全基因组关联分析. *中国农业科学*, 2017, 50: 228–239.
- Zhou Q H, Zhou C, Zheng W, Fu D H. Genome wide association analysis of silique length in *Brassica napus* L. *Sci Agric Sin*, 2017, 50: 228–239 (in Chinese with English abstract).
- [53] Li N, Li Y. Signaling pathways of seed size control in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2016, 33: 23–32.
- [54] 张雪晶, 江文波, 庞永珍. 植物种子大小调控机制的研究进展. *植物生理学报*, 2016, 52: 998–1010.
- Zhang X J, Jiang W B, Pang Y Z. Advances in the regulation mechanism of plant seed size. *J Plant Physiol*, 2016, 52: 998–1010 (in Chinese with English abstract).